

文章编号:1001-5914(2005)06-0422-03

# 甲醛暴露的医学生口腔黏膜细胞的 DNA-蛋白质交联

颜进<sup>1</sup>, 刘英帅<sup>2</sup>, 迟欣<sup>1</sup>, 鲁志松<sup>2</sup>, 石玉琴<sup>1</sup>, 杨旭<sup>2</sup>, 张本延<sup>1</sup>

**摘要:**目的 研究医学生上解剖课甲醛暴露后对口腔黏膜 DNA-蛋白质交联(DPC)的影响。方法 以 37 名(男 20 名, 女 17 名)正在上解剖课程的医学院学生和 40 名(男 20 名, 女 20 名)同年级理学院的学生为研究对象。取口腔黏膜上皮细胞, 应用改良的 SDS-KCl 沉淀法, 测定口腔黏膜细胞 DNA-蛋白质交联率。结果 两组学生性别和年龄构成差异无统计学意义。解剖实验室空气甲醛浓度范围在 0.42~1.57 mg/m<sup>3</sup> 之间。医学院学生口腔黏膜细胞 DNA-蛋白质交联率(25.72%±6.48%)高于对照组(22.88%±5.34%),  $P<0.05$ 。其中医学院女生 DNA-蛋白质交联率(27.72%±5.76%)明显高于对照组女生(22.29%±4.20%),  $P<0.01$ 。结论 医学生解剖课甲醛暴露可导致口腔黏膜细胞 DNA-蛋白质交联率增高。女性对气态甲醛暴露可能较男性敏感。

**关键词:** 甲醛; DNA-蛋白质交联; 学生; 口腔黏膜细胞

中图分类号: R181.3

文献标识码: A

**Effect of Air Formaldehyde Exposure of Medical Students on DNA-Protein Crosslinks in Their Buccal Mucosa Cells**  
YAN Jin, LIU Ying-shuai, CHI Xin, et al. Department of Occupation Health Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430080, China

**Abstract: Objective** To study the effect of formaldehyde exposure on DNA-protein crosslinks (DPC) in buccal mucosa cells in students who were taking anatomy course. **Methods** The modified SDS-KCl precipitation assay published by Zhitkovich and Costa in 1992 was applied to detect DNA-protein crosslinks in human cells. And this method has been used to explore DPC induced by different pollutants in numerous studies. 37 medical students (20 males and 17 females) aged 19.24±1.09 (mean±standard deviation) and 40 students (20 males and 20 females) in natural science college aged 19.55±0.99 (mean±standard deviation) were studied. The frequency of exposure to formaldehyde was 6 h per week in exposed group. **Results** Concentrations of formaldehyde in anatomy laboratory ranged from 0.42 to 1.57 mg/m<sup>3</sup>. Exposure to formaldehyde resulted in an increase of DNA-protein crosslinks. The percentage (mean±standard deviation) of DNA-protein crosslinks in exposed and nonexposed students were 25.72%±6.48% and 22.88%±5.34% respectively ( $P<0.05$ ). Formaldehyde caused a significant increase in DNA-protein crosslinks of the females in two groups (27.72%±5.76% and 22.29%±4.20%,  $P<0.01$ ). However, there was no difference in males (24.02%±6.72% and 23.48%±6.33%,  $P>0.05$ ). **Conclusion** The result of the present study suggests that formaldehyde exposure in medical students increases the frequency of DNA-protein crosslinks in buccal mucosa cells and females may be more sensitive to formaldehyde exposure.

**Key words:** Formaldehyde; DNA-protein crosslinks; Student; Buccal mucosa cell

甲醛(formaldehyde)是无色, 无味, 有强烈刺激性气味的气体。易溶于水, 其 35%~40% 的水溶液通称为福尔马林, 常作为医学解剖实验室的尸体防腐剂。许多研究表明, 医学生接触甲醛后能够引起血液淋巴细胞、鼻腔细胞和口腔黏膜上皮细胞的微核细胞率增加。1996 年, 美国健康基金委员会(American Health Foundation)专家组的报告指出, 在气态甲醛的遗传毒性和致癌作用中, 起到首要作用的是 DNA-蛋白质交联(DNA-protein crosslinks, DPC)形成<sup>[1]</sup>。甲醛所致的 DPC 是甲醛遗传毒性和致癌作用研究的重要组成部分。国外众多的研究提出, 应用血液淋巴细胞和鼻腔细胞的 DPC 作为甲醛暴露的生物标志物<sup>[2-4]</sup>。口腔黏膜上皮细胞也是吸入甲醛暴露的靶器官, 但目前未见到人群口腔黏膜细胞 DPC 的相关研究报道。为此, 我们于 2004 年 4 月收集

了医学院进修解剖课程的学生的口腔黏膜细胞, 应用 Zhitkovich 和 Costa 于 1992 年报道的改良 SDS-KCl 沉淀法<sup>[5]</sup>, 测定了口腔黏膜细胞 DNA-蛋白质交联率, 研究气态甲醛暴露对口腔黏膜细胞 DPC 的影响。

## 1 内容与与方法

### 1.1 观察对象

选择某大学医学院 2003 年入学的一年级正在上解剖课的 37 名学生[男生 20 名, 女生 17 名, 平均年龄(19.24±1.09)岁]为暴露组。学生每周 2 次解剖课均在解剖实验室进行, 每次 3 学时, 已经连续上课 8 周。选择同年某大学理学院 40 名一年级学生[男生 20 名, 女生 20 名, 平均年龄(19.55±0.99)岁]为对照组。对照组均无甲醛接触史。经  $t$  检验和  $\chi^2$  检验, 暴露组与对照组年龄和性别构成差异均无统计学意义( $P$  均  $>0.05$ )。

### 1.2 室内空气甲醛浓度测定

分别对医学院解剖实验室和理学院教室空气中的甲醛浓度进行测定。同时选取两学院的学生寝室为对

作者单位: 1. 武汉科技大学医学院预防医学系(湖北 武汉 430080); 2. 华中师范大学生命科学院(湖北 武汉 430079)

作者简介: 颜进(1978-), 男, 硕士研究生, 从事甲醛毒性研究。

通讯作者: 张本延, Tel: (027) 86830745; E-mail: zbyan1000@sohu.com

照以比较空气中的甲醛浓度。解剖实验室容积为 9.42 m × 8.93 m × 2.93 m = 246 m<sup>3</sup>。吊顶上分布 16 个送风散流器, 4 排 4 列。该实验室内放置 2 列 4 排解剖台, 解剖台为上下双层储存尸体标本, 在每个解剖台上层均有排风口。标本不用时用铁盖盖严。选取 3 个检测点, A 点位于右列第 4 排解剖台旁, B 点位于左列第 3 排解剖台旁, C 点位于左列第 4 排解剖台旁, 均避开排风口。测定高度距地面 1.5 m, 记录各点 3 min 内瞬时空气中甲醛的最高浓度。检测点甲醛浓度均用美国 Interscan 4160-2 型甲醛分析仪进行测量, 并记录检测点的温度、湿度和大气压力。

1.3 DNA-蛋白质交联率的测定

1.3.1 口腔黏膜采样 受试者首先清水漱口 3 次, 将口腔食物残渣冲洗干净。用软毛牙刷上下中等力度刷两侧口腔黏膜内壁各 30 次, 范围尽量广泛。刷完后用 10 ml 生理盐水漱口, 让生理盐水冲洗刷过的黏膜。收集漱口后的生理盐水于离心管中。

1.3.2 分离结合 DNA 收集到的细胞液 4℃ 4 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。2.0 ml PBS(pH=7.5)缓冲液中重悬浮, 分别取 0.5 ml 重悬浮细胞液, 装入 3 只 1.5 ml 的离心管中, 编号。3 只加入 0.5 ml 4% 十二烷基苯磺酸钠(SDS)+20 mmol/L Tris-HCl 裂解液中裂解, 轻微涡旋振荡。裂解样本放置 -70℃ 冰箱保存, 直至实验。

裂解样本 37℃ 水浴解冻后, 将混合液 10 次穿过 1 ml 的聚丙烯枪头, 使 DNA 长度统一。加入 100 mmol/L Tris-HCl, 1.0 mol/L KCl 溶液 100 μl, 形成白色絮状沉淀。样本涡旋 5 s 后 65℃ 水浴加热 10 min。在冰上冷冻样品 5 min 后, SDS-KCl 沉淀形成。4℃ 10 000 r/min 离心 5 min 收集上清。沉淀加 1 ml 0.1 mol/L KCl+20 mmol/L Tris-HCl 重悬浮, 然后在 65℃ 水浴中加热 10 min。冰上冷冻 5 min, 同前加热, 冷冻, 离心步骤 3 次, 收集每次上清液(未结合 DNA)。最终沉淀重悬浮于 0.5 ml 清洗缓冲液后涡旋, 再加入 0.5 ml 0.4 mg/ml 蛋白酶 K 液 50℃ 消化 3 h。样本冰上冷冻 5 min, 4℃ 11 000 r/min 离心 10 min 收集上清液(结合 DNA)。

取小牛胸腺 DNA 溶于清洗缓冲液, 配制终浓度分别为 0、100、200、300、400、500、750、1 000、2 000、3 000、5 000 ng/ml 的 DNA 标准液 1 ml。加入 1 ml 新鲜配制 200 ng/ml 荧光染料 Hoechst 33258, 置于暗处 30 min。取一已染色的 DNA 标准液, 岛津 Shimadzu RF-5301PC 荧光分光光度计于最适发射波长(350 nm)和激发波长(450 nm)扫描。设定参数后, 扫描各浓度标准液, 做出标准曲线。

1.3.3 测定 DPC 浓度 结合和未结合 DNA 液各取 1 ml 加入 1 ml 新鲜配制的 200 ng/ml 荧光染料 Hoechst 33258, 置于暗处 30 min。在与标准液同样检测条件下测定浓度

1.3.4 计算 DPC 率 根据公式(1)计算 DPC 率(%)

$$DPC \text{ 率}(\%) = c_1 / (c_1 + c_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中: c<sub>1</sub>—结合 DNA 浓度, ng/ml; c<sub>0</sub>—未结合 DNA 浓度, ng/ml。

1.4 统计分析

采用 SAS 8.1 统计软件进行数据处理, 进行 t 检验, χ<sup>2</sup> 检验, 方差分析。

2 结果

2.1 室内空气中甲醛浓度

2.1.1 实验室空气中甲醛浓度 表 1 可见, 解剖实验室任意一点空气中甲醛浓度明显高于室内空气甲醛浓度的国家标准(0.08 mg/m<sup>3</sup>)。打开尸台铁盖前, 实验室 3 个检测点空气甲醛平均浓度为 0.42 mg/m<sup>3</sup>。开盖后浓度急剧上升, 最高达 12.04 mg/m<sup>3</sup>, 打开通风系统后, 甲醛浓度开始迅速回落, 在 50~60 min 测量时, 甲醛浓度趋于稳定, 三点最低浓度平均为 1.57 mg/m<sup>3</sup>。学生上理论课时不开铁盖, 实践课时, 开盖并打开通风系统。每次解剖课理论和实践占学时各半。因此, 学生甲醛暴露水平应在 0.42~1.57 mg/m<sup>3</sup> 之间。

表 1 实验室空气中甲醛浓度于打开尸台上的铁盖后 10~60 min 的变化情况 (mg/m<sup>3</sup>)

检测点	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
A	0.44	4.89	8.01	9.35	2.85	1.90	1.45
B	0.32	7.83	12.04	9.81	2.63	2.01	1.56
C	0.49	8.59	10.34	11.18	2.21	1.69	2.21

注: 0 min 指未打开尸台上的铁盖时所测的甲醛浓度, 10 min 开始为打开铁盖时甲醛的浓度, 37 min 时打开通风设备。

2.1.2 教室和寝室内空气中甲醛浓度 理学院教室和两学院学生寝室各取 3 个检测点测定空气中甲醛浓度。理学院教室空气中甲醛浓度(0.012~0.024 mg/m<sup>3</sup>)和两学院学生寝室内甲醛的浓度(0.012~0.037 mg/m<sup>3</sup>, 0.024~0.037 mg/m<sup>3</sup>)均低于 0.08 mg/m<sup>3</sup>, 而且相互之间差异无统计学意义。

2.2 口腔黏膜细胞 DPC 实验结果

暴露组和对照组学生口腔黏膜细胞 DPC 率分别为 25.72%±6.48% 和 22.88%±5.34%, P<0.05, 差异有统计学意义。按性别分组比较, 暴露组女生 DPC 水平显著高于对照组, 而两组男生之间差异无统计学意义(表 2)。方差分析显示, 女生暴露组与女生对照组及男生对照组差异有统计学意义(P<0.05), 其他各组间差异均无统计学意义。

表 2 暴露组和对照组学生口腔黏膜细胞 DPC 率 (x̄±s)

组别	男生		女生		合计	
	人数	DPC 率(%)	人数	DPC 率(%)	人数	DPC 率(%)
暴露组	20	24.02±6.72	17	27.72±5.76	37	25.72±6.48
对照组	20	23.48±6.33	20	22.29±4.20	40	22.88±5.34
t 值	0.26		3.31		2.1	
P 值	0.795 3		0.002 2		0.039 1	

### 3 讨论

近年的研究表明,许多外来化学物均可引起 DPC,虽然不同的化学物引起 DPC 的机制不尽相同,但 DPC 一旦形成,必将对 DNA 的构象与功能产生严重影响,这可能与和 DNA 交联的核蛋白有关。因为核蛋白是维持 DNA 构象的重要成分,并参与调控 DNA 的复制与转录。此外,由于 DPC 修复困难,在 DNA 复制过程中可造成某些重要的基因丢失。因此,DPC 作为遗传毒性的生物标志可能具有重要的价值<sup>[6]</sup>。

上皮组织是毒物细胞毒性和基因毒性研究常用的组织模型。脱落的口腔上皮组织是研究吸入和食物暴露的很好组织来源<sup>[7]</sup>。Burgaz 等<sup>[8]</sup>对甲醛暴露人群的口腔上皮细胞进行了微核实验。调查收集了 22 名小制鞋厂工人和 28 名在病理及解剖实验室工作的科研人员,以及作为对照的 18 名志愿者的脱落口腔黏膜细胞。发现两个暴露组口腔黏膜细胞的微核细胞数明显高于对照组。Norppa 等<sup>[9]</sup>报道了聚合板和玻璃纤维工厂工人的口腔黏膜细胞的微核细胞数明显增加,但是没有发现淋巴细胞的改变。Suruda 等<sup>[10]</sup>研究显示,学生上解剖课时,低水平甲醛暴露(0.44 mg/m<sup>3</sup>)后,男性学生口腔上皮细胞微核率比对照组升高了 12 倍,淋巴细胞的微核率比对照高 22%。Holland 等<sup>[11]</sup>发现,在解剖实验室上课的学生口腔上皮细胞微核率比对照组增加了 3 倍,但是鼻腔细胞却没有变化。Ying 等<sup>[12]</sup>同样对上解剖课(甲醛浓度 0.67 mg/m<sup>3</sup>)的学生进行研究,口腔上皮细胞和鼻腔细胞微核率增加了 1.5 倍,同时,血液淋巴细胞没有明显增加。

以上文献研究表明,在低浓度甲醛暴露情况下,口腔黏膜细胞可能有更明显的细胞毒性改变。但是关于甲醛暴露导致的 DPC 研究中,一般采用血液淋巴细胞和鼻腔细胞作为对象。最近,国内有学者建立了甲醛暴露导致口腔黏膜细胞 DPC 的模型。采用口腔黏膜细胞检测 DPC 至少有以下优点:(1)低浓度甲醛暴露口腔黏膜细胞 DPC 改变可能有更高的灵敏度;(2)采样方便,提取口腔黏膜细胞不需要特殊的器材和试剂;采样过程快捷,无痛,接受程度高,有利于大样本的人群调查;(3)实验样本便于保存,可长期存放而不影响结果。

Shaham 等<sup>[3]</sup>分析了甲醛职业暴露人群( $n=12$ )和非暴露对照人群( $n=8$ )外周血液白细胞 DPC。平均暴露年限为 13 a,在工作时,个体暴露于甲醛的浓度范围在 1.85~2.14 mg/m<sup>3</sup>,平均浓度为 1.96 mg/m<sup>3</sup>。暴露组的 DPC 交联率显著高于对照组,各自交联率分别为 28%±5%和 22%±6%。其对照组交联率数值和本研究中对照组接近,暴露组交联率高于本研究,这种差别可能是样本例数和暴露水平及时间的不同造成的。由于样本例数较少,Shaham 没有对不同性别组进行比较。在以往文献中也很少提到用甲醛暴露致 DPC 的性别差异。本次研

究中发现,医学生解剖课上接触甲醛后导致口腔黏膜细胞 DPC 百分率增加,其中女生暴露组与女生对照组的交联率有明显差异,但是男生暴露组与男生对照组的交联率差异无统计学意义,女生暴露组与男生暴露组之间差异也无统计学意义。由于学生甲醛暴露的水平较低且时间较短,可能提示女性对甲醛暴露较男性敏感。这种差异可能来源于以下几个方面<sup>[13]</sup>:(1)外源性化合物的代谢速度。动物实验表明,一般雄性代谢化合物比雌性更快速;(2)排泄的性别差异;(3)激素和遗传因素的影响。青春期激素水平的差异可能影响对外源性化合物的敏感性。

本次研究的解剖实验室虽然拥有良好的通风设备,但是其空气中甲醛浓度仍然高于国家标准限值(0.08 mg/m<sup>3</sup>)。因此,对医学生上解剖课时的个人防护应引起重视。

#### 参考文献:

- [1] Conaway CC, Whysner J, Lynne K, et al. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation, *Pharmacol(J). Ther*, 1996, 71: 29-55.
- [2] Zhong W, Que HSS. Formaldehyde-induced DNA adducts as biomarkers of in vitro human nasal epithelial cell exposure to formaldehyde [J]. *Mutat Res*, 2004, 563:13-24.
- [3] Shaham J, Bomstein Y, Meltzer A. DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde in vitro and in vivo studies [J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17:121-125.
- [4] Kuykendall JR, Trela BA, Bogdanffy MS. DNA-protein crosslink formation in rat nasal epithelial cells by hexamethylphosphoramide and its correlation with formaldehyde production [J]. *Mutat Res*, 1995, 343:209-218.
- [5] Zhitkovich A, Costa M. A simple, sensitive assay to detect DNA-protein-crosslinks in intact cells and in vivo [J]. *Carcinogenesis*, 1992, 13: 1485-1489.
- [6] 雷毅雄,庄志雄.外来化学物与 DNA-蛋白质交联物关系的研究进展 [J]. *国外医学 卫生学分册*, 1995, 22: 149-153.
- [7] Stone JG, Jones NJ, McGregor AD, et al. Development of a human biomonitoring assay using buccal mucosa: comparison of smoking-related DNA adducts in mucosa versus biopsies [J]. *Cancer Research*, 1995, 55:1267-1270.
- [8] Burgaz S, Onur E, Cakmak G. Cytogenetic analysis of buccal cells from shoeworkers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde [J]. *Biomarkers*, 2002, 7: 151-161.
- [9] Norppa, H, Luomahaara S, Heikonen H, et al. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens [J]. *Environ Health Perspect*, 1993, 101 (suppl): 519-525.
- [10] Suruda A, Schulte P, Boeniger M, et al. Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science [J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1993, 2: 453-460.
- [11] Holland N, Levine AJ, Smith MT, et al. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence insitu hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde [J]. *Mutat Res*, 1996, 371: 237-248.
- [12] Ying CJ, Yan WS, Zhao MY, et al. Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 1997, 10: 451-455.
- [13] 王心如.毒理学基础 [M]. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2003. 99.

(收稿日期:2005-03-18)

(本文编辑:杜宇欣)